

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-256812

(43)Date of publication of application : 08.10.1993

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

G01N 27/28

(21)Application number : 04-087827

(71)Applicant : TOTO LTD

(22)Date of filing : 10.03.1992

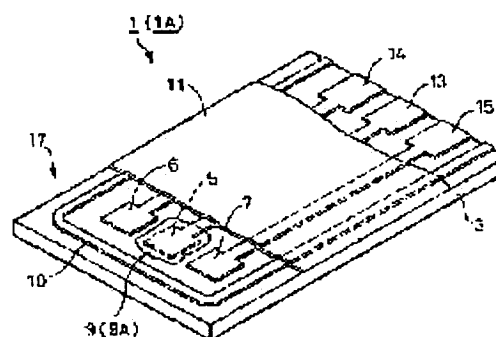
(72)Inventor : OGURA KENJI

## (54) BIOSENSOR

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To easily prevent the deterioration in measurement accuracy of a biosensor caused by the temperature of a solution to be measured.

**CONSTITUTION:** This biosensor is constituted of an insulating substrate 3 formed by sintering alumina and a working electrode 5, reference electrode 6, and counter electrode 7 made of platinum and a self-temperature controlling heater 10 which is formed of a Pt-Pd alloy and has a self-controlling temperature of 37° C, all of which are formed on the upper surface of the substrate 3. A discriminating layer 9 carrying glucose oxidase and a ferrocene derivative is fixed to the upper surface of the electrode 5. Then prescribed low voltages for measurement are applied across the electrodes 5 and 6 and across the electrodes 7 and 6 and an electric current is always supplied to the heater 10. Therefore, the biosensor outputs its output while the heater 10 maintains the periphery of the electrode 5 at 37° C.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 26.06.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 01.08.2000

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 5 - 2 5 6 8 1 2

(43) 公開日 平成 5 年 ( 1 9 9 3 ) 1 0 月 8 日

(51) Int. Cl.

識別記号

序内整理番号

F 1

技術表示箇所

G01N 27/327

27/28

331

Z

7235-2J

7235-2J

G01N 27/30

353

Z

7235-2J

355

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願平 4 - 8 7 8 2 7

(71) 出願人

0 0 0 0 1 0 0 8 7

東陶機器株式会社

(22) 出願日

平成 4 年 ( 1 9 9 2 ) 3 月 1 0 日

福岡県北九州市小倉北区中島 2 丁目 1 番 1 号

(72) 発明者

小椋 健二

福岡県北九州市小倉北区中島 2 丁目 1 番 1 号 東陶機器株式会社内

(74) 代理人

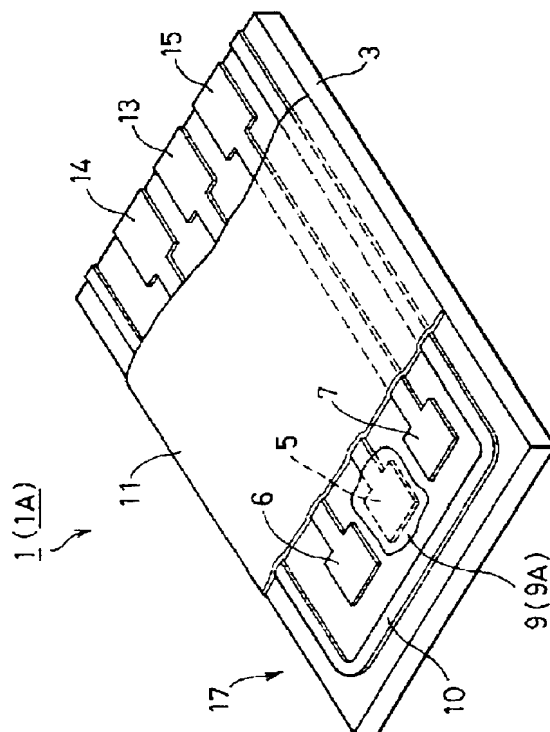
弁理士 五十嵐 孝雄 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ

(57) 【要約】

【目的】 被測定溶液の温度による測定精度の低下回避を簡略化する。

【構成】 バイオセンサ 1 は、アルミナを焼結して作成した絶縁基板 3 上面に、白金で形成した作用極 5、参照極 6 及び対極 7 と、Pt-Pd 合金で形成され 37℃ が自己制御温度の自己温度制御ヒータ 10 とを備え、作用極 5 の上面には、グルコースオキシダーゼとフェロセン誘導体とを担持した識別層 9 を固定して備える。そして、作用極 5 と参照極 6 の間及び対極 7 と参照極 6 の間に所定の測定用微弱電圧の印加を受け、自己温度制御ヒータ 10 には常時電流の通電を受ける。これにより、自己温度制御ヒータ 10 が作用極周辺を 37℃ に維持しながら、センサ出力を出力する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 被測定溶液中の測定対象物質と生体物質との生物化学的反応に基づいて、該測定対象物質濃度を電気量に変換するバイオセンサにおいて、

絶縁基板に設けられ、少なくとも作用極を含む一組の電極系と、

前記測定対象物質に対する識別機能を有する生体物質を担持して、前記電極系の作用極表面に形成された識別層と、

前記作用極の近傍温度を所定温度に維持する温度維持手段とを備えることを特徴とするバイオセンサ。 10

【請求項2】 前記温度維持手段は、

外部から供給された電流に基づいて発熱し、自己の温度が前記所定温度に達すると自己の抵抗値を増大させて前記所定温度を超える温度になることを回避する自己温度制御ヒータを、前記絶縁基板における作用極近傍に形成してなることを特徴とする請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 前記所定温度は、測定時における前記被測定溶液の温度であることを特徴とする請求項1又は請求項2記載のバイオセンサ。 20

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、測定対象物質に対する識別機能を有する生体物質と被測定溶液中の測定対象物質との生物化学的反応に基づいて、測定対象物質濃度を電気量に変換するバイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】この種のバイオセンサは、酵素や微生物といった生体物質と測定対象物質とで進行する生物化学反応を利用して、尿などの被測定溶液中の測定対象物質を測定するものであり、種々のものが知られている。例えば、特開昭61-291356号には、次のような電極型のバイオセンサが提案されている。このバイオセンサは、セラミックやプラスチック等の絶縁基板に作用極を含む電極系とサーミスタ等の温度検出素子とを設け、グルコースオキシゲナーゼ（生体物質）を含んだ多孔体、即ち識別層を作用極上に積層するよう形成して作製されている。 30

【0003】このバイオセンサを用いた測定対象物質濃度の測定は、各電極に接続された電気測定部を用いて次のように行なわれる。まず、測定対象物質を含有する被測定溶液に多孔体を接触させる。これにより、作用極上の生体物質と被測定溶液に含まれている測定対象物質とで生物化学反応が進行して、例えば酵素が消費されて過酸化水素が生成する。こうして消費或いは生成する電極活性物質の電極反応で得られた電極間の電流値を電気測定部で測定するとともに、温度検出素子から被測定溶液温度を電気測定部で読みとる。そして、読みとった温度で電極間電流値（セ・サ出力）を補正し、補正後の電流 50

値を測定対象物質の濃度に換算するのである。そしてこのように温度補正することにより、被測定溶液温度による測定精度の低下を回避している。

【0004】なお、この他に、セラミックやプラスチック等の絶縁基板上に作用極等の各電極を形成し、作用極上に識別層を積層して形成した平板型の電極型バイオセンサも実用されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、この温度補正を用いた濃度換算に先だって、センサ出力と測定対象物質濃度と温度との3者の対応関係を予め求めておく必要があり煩雑である。具体的には、センサ出力と測定対象物質濃度とを対応付けたいわゆる検量線を温度ごとに複数求めておかなければならない。また、検出温度がこの対応関係にない温度である場合には、補完計算を必要とし煩雑である。

【0006】本発明は、上記問題点を解決するためになされ、被測定溶液の温度による測定精度の低下回避を簡略化することをその目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】かかる目的を達成するために本発明の採用した手段は、被測定溶液中の測定対象物質と生体物質との生物化学的反応に基づいて、該測定対象物質濃度を電気量に変換するバイオセンサにおいて、絶縁基板に設けられ、少なくとも作用極を含む一組の電極系と、前記測定対象物質に対する識別機能を有する生体物質を担持して、前記電極系の作用極表面に形成された識別層と、前記作用極の近傍温度を所定温度に維持する温度維持手段とを備えることをその要旨とする。

【0008】そして、外部から供給された電流に基づいて発熱し、自己の温度が前記所定温度に達すると自己の抵抗値を増大させて所定温度を超える温度になることを回避する自己温度制御ヒータを絶縁基板における作用極近傍に形成して、上記温度維持手段とした。

【0009】また、温度維持手段により維持される所定温度を、測定時における被測定溶液の温度とした。

【0010】

【作用】上記構成のバイオセンサは、絶縁基板に設けられた一組の電極のうちの作用極表面に生体物質を担持した識別層を形成しており、この識別層における生体物質と被測定溶液中の測定対象物質との間で進行する生物化学反応に基づいて、測定対象物質濃度を電気量に変換する。これにより、測定対象物質濃度の測定が可能となる。この場合、本発明のバイオセンサは、温度維持手段により作用極の近傍温度を所定温度に維持するので、濃度測定に当たって被測定溶液の温度補正を必要としない。

【0011】更に、温度維持手段は、自己温度制御ヒータを絶縁基板における作用極近傍に形成して構成されているので、フィードバック制御等を行なうことなく作用

極近傍温度を所定温度に維持する。

【0012】また、維持する温度を測定時における被測定溶液温度にすることで、作用極近傍温度と被測定溶液温度との差がなくなりより一層の精度向上を図ることが可能となる。

【0013】

【実施例】以上説明した本発明の構成・作用を一層明らかにするために、以下本発明の好適な実施例について説明する。図1は、実施例のバイオセンサ1の斜視図である。

【0014】実施例のバイオセンサ1は、平板型の電極型バイオセンサであり、次のような構成を備える。即ち、図1に示すように、バイオセンサ1は、アルミナを焼結して作成した板厚2.5mmの絶縁基板3と、この絶縁基板3上に形成された作用極5、参照極6及び対極7と、作用極5の上面に所定の生体物質を担持して積層・形成された識別層9と、これら各電極を取りまきよう形成された自己温度制御ヒータ10と、各電極及び自己温度制御ヒータ10の間を絶縁する焼結絶縁層11と、作用極5及び参照極6、対極7の端子部13、14、15とを備える。この識別層9が形成された側が、このバイオセンサ1の感応部17となる。なお、以下の説明に当たっては、バイオセンサ1をグルコース測定用のバイオセンサとして説明する。

【0015】このバイオセンサ1は、図示しない電気測定部に接続され、この電気測定部から作用極5と参照極6の間及び対極7と参照極6の間に所定の測定用微弱電圧（通常0.4～0.6V）の印加を受ける。そして、被測定溶液中の測定対象物質と識別層9におけるグルコースオキシダーゼ（GOD）との生物化学的反応に基づいて、測定対象物質濃度を変換した電気量、即ち作用極5と参照極6間の電気変化量（電流値）と、対極7と参照極6間の電気変化量とを出力する。これを受けた電気測定部は、センサ出力としてこの二つの電気変化量の差を処理し、この電気変化量差をもって、被測定溶液、例えば尿中のグルコース濃度を算出する。

【0016】次に、上記バイオセンサ1の製造工程について説明する。まず、次のようにしてアルミナグリーンシートを作製する。つまり、平均粒径が約1.5 $\mu$ mのアルミナ粉末（50wt%）と平均粒径が約8 $\mu$ mのアルミナ粉末（50wt%）に、両アルミナ粉末量に対して外掛けで0.5～5%の量の有機バインダを加え、水に分散してサドルミルで撹拌混合し、粘土状原料を調製する。この原料を1日熟成した後、押出成形機で平板状の生のグリーンシートを生製し、これを50℃の恒温環境下で24時間乾燥させグリーンシートを作製する。使用する有機バインダは、CMC（カルボキシル・メチルセルローフ）、ポリビニルアルコール、アルギン酸ソーダ等から選ばれる。

【0017】そして、このグリーンシートの上面に、作

用極5と参照極6及び対極7と各電極の端子部13、14、15をPt（白金）にて図1におけるパターンでハート印刷するとともに、自己温度制御ヒータ10をPt-Pd合金にて図1におけるパターンでスクリーン印刷する。この自己温度制御ヒータ10をスクリーン印刷する際のPt-Pd合金におけるPtとPdとの混合割合は、バイオセンサ1にて尿中成分測定することを想定して、一般的な尿の温度である37℃が自己温度制御ヒータ10の自己制御温度となるよう定められている。具体的には、PtとPdとの混合割合（重量比）は、93：7である。

【0018】こうしてスクリーン印刷が完了すると、各電極の感応部17側部位と各電極の端子部を除く範囲に亘って無機質の焼結材を塗布し、グリーンシートを酸化雰囲気下で1250℃・12時間の焼結条件で焼結する。こうして、各電極及び自己温度制御ヒータ10を備えた絶縁基板3と、焼結絶縁層11ができあがる。

【0019】その後、次のようにして、識別層9を形成する。この識別層9は、グルコースに対する識別機能を有するグルコースオキシダーゼを担持して固定化させたものであり、次のようにして形成した。まず、99.1wt%のコラーゲと0.5wt%のグルコースオキシダーゼ（GOD）と0.1wt%のフェロセン誘導体とを混合してGOD水溶液を調製する。そして、マイクロリットルにて、感応部17側の作用極5及び参照極6、対極7上面へこのGOD水溶液を約20 $\mu$ mの厚さで塗布し、その後室温で2時間自然乾燥させて固化させ、識別層9を形成した。こうして本実施例のバイオセンサ1が完成する。なお、識別層9におけるフェロセン誘導体は、電子の移動を可能とする電子移動体である。

【0020】次に、完成したバイオセンサ1の評価試験について説明する。この評価試験を行なうに当たっては、各濃度に調製されたグルコース試薬A（溶存酸素8.5ppm）におけるグルコース濃度測定と、尿等の低溶存酸素濃度溶液を想定して各濃度に調製されたグルコース試薬B（溶存酸素1.0ppm）におけるグルコース濃度測定とを行なった。なお、各試薬における調製グルコース濃度及び試薬温度は後述の表1の通りである。

【0021】この各グルコース試薬A、Bに上記実施例のバイオセンサ1をそれぞれ浸漬し、得られたセンサ出力（電流値）を図2に示す検量線Kcalとからグルコース濃度を求めた。その結果を表1に示す。作用極5と参照極6の間及び対極7と参照極6の間に印加した測定用微弱電圧は、0.6Vであり、バイオセンサとしてのセンサ出力（作用極5と参照極6間の電流値と対極7と参照極6間の電流値との差）は10 $\mu$ Aのオアターの電流値として観測された。また、自己温度制御ヒータ10には常時0.1Aの電流を通电しておき、37℃で自己温度制御させた。つまり、作用極近傍（周辺）の温度を被

測定溶液であるグルコース試薬の温度と一致させたり、試薬温度に近い温度とする。

【表1】

区分	試薬温度 ℃	調製グルコース濃度 mg/dl	測定グルコース濃度 mg/dl
グル コ ー ス 試 薬 A	25	40	38
		100	95
		200	192
	30	40	39
		100	103
		200	198
	37	40	43
		100	105
		200	198
	40	40	38
		100	95
		200	181
グル コ ー ス 試 薬 B	30	40	38
		100	99
		200	192
	35	40	44
		100	99
		200	189
	37	40	38
		100	99
		200	206
	40	40	37
		100	91
		200	183

表中の測定グルコース濃度は、5回の平均値である。

【0022】表1から明かなように、グルコース試薬A、Bともに、バイオセンサ1によれば、各試薬温度に亘って正確にグルコース濃度を測定できた。しかも、その際に、自己温度制御ヒータ10に0.1Aの電流を通电して作用極近傍(周辺)温度を試薬温度に近似させておくだけでよく、従来必要であった補正処理を必要としない。よって、本実施例のバイオセンサ1によれば、何等特別な処理を行なうことなく簡単に、グルコース試薬の温度による測定精度の低下を回避することができ、また、被測定溶液温度と自己温度制御ヒータ10による制御温度を近づけたので、一層正確にグルコース濃度を求めることができる。

【0023】本実施例のバイオセンサ1では、自己温度制御ヒータ10をPt-Pd合金で作製し絶縁基板3をアルミナ焼結体から作製したので、ヒータと基板の熱膨張係数の整合性を確保でき、熱応力による基板のひび割れ、損傷及び変形や、ヒータの基板表面からの剥離等を回避することができ、また、自己温度制御ヒータ10を作製するPt-Pd合金は焼成後にも化学変化を起こすことがないので、ヒータの発熱により基板中のアルミナと上記合金とが反応を起こすことがなくなり、ヒータの劣化や断線等を回避してヒータの信頼性を向上させることができる。

【0024】次に、他の実施例について説明する。この実施例におけるバイオセンサ1Aでは、上記したバイオセンサ1の識別層9に、グルコースオキシダーゼとユビキノン(フェロセン誘導体と同様の電子移動体)の他に、酸化作用を有する過ヨウ素酸ソーダ(NaIO<sub>4</sub>)を担持させた点で、上記バイオセンサ1と異なる。このため、その製造に際しては、バイオセンサ1と同様にして絶縁基板3、各電極及び自己温度制御ヒータ10の形成等を行ない、次のようにして識別層9Aを形成した。

【0025】バイオセンサ1Aにおける識別層9Aは、9.8、8wt%のコラーゲンと、0.5wt%のグルコースオキシダーゼ(GOD)と、0.2wt%のユビキノンと、0.5wt%の過ヨウ素酸ソーダを加えてGOD-Ptペーストを調製する。そして、端子部13と反対側の作用極5端面にこのGOD-Ptペーストを約20μmの厚さで塗布し、その後24時間自然乾燥させて固化(ゲル化)させ、識別層9を形成した。

【0026】このバイオセンサ1Aを用いて上記グルコース試薬A、Bについてバイオセンサ1と同様の評価試験を行なったところ、やはり各試薬温度に亘って正確にグルコース濃度を測定でき、グルコース試薬の温度による測定精度の低下を簡単に回避することができた。

【0027】次にバイオセンサ1Aを用いて尿中のグルコースを測定することを想定して、次の実験を行なっ

た。試験に供するグルコース試薬Cは、その溶存酸素が4、5 ppmの尿と同程度であり、アスコルビン酸、尿酸、ビリルビン等を尿と近似した成分比で含有する。その含有量は、次の通りである。また、このアスコルビン酸、尿酸、ビリルビン等は、グルコース測定を阻害する妨害物質である。

アスコルビン酸：1.5 mg/dl

尿酸：5.0 mg/dl

ビリルビン：0.5 mg/dl

また、グルコース試薬Cにおける調製グルコース濃度及び試薬温度は後述の表2の通りである。

区分	試薬温度 ℃	調製グルコース濃度 mg/dl	測定グルコース濃度 mg/dl
グル コ ー ス 試 薬 C	30	40	45
		100	109
		200	211
	35	40	41
		100	110
		200	208
	40	40	39
		100	98
		200	192

表中の測定グルコース濃度は、やはり5回の平均値である。

【0029】表2から明かなように、アスコルビン酸、尿酸、ビリルビン等の妨害物質を尿と近似した成分比で含有した低溶存酸素のグルコース試薬Cであっても、バイオセンサ1Aによれば、各試薬温度に亘る正確なグルコース濃度の測定と、グルコース試薬の温度による測定精度の低下の簡単な回避とを図ることができた。この結果、グルコースオキシダーゼとともに過ヨウ素酸ソーダを識別層9Aに担持したバイオセンサ1Aは、作用極近傍（周辺）温度を試薬温度に近似させることと相まって、低溶存酸素で妨害物質を必然的に含有する尿におけるグルコース測定に適したセンサとなる。

【0030】バイオセンサ1Aがグルコース試薬、即ち尿におけるグルコース濃度を正確に測定できるのは、次のような理由による。アスコルビン酸、尿酸、ビリルビン等の妨害物質は、負極に帯電して還元性を示し、グルコースとグルコースオキシダーゼとの間の生物化学反応に伴う電極反応を妨害する。しかし、これら妨害物質が被測定溶液に存在していても、識別層9Aに担持した過ヨウ素酸ソーダが酸化させ無害化させる。このため、これら妨害物質の影響を、識別層9Aに過ヨウ素酸ソーダを担持させるという簡単な構成で排除して、尿におけるグルコースの測定精度を向上させることができるのである。

【0031】なお、この発明は上記実施例に限られるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲において種々の態様において実施することが可能であり、次のような変

【0028】この各グルコース試薬Cにバイオセンサ1Aをそれぞれ浸漬し、得られたセンサ出力（電流値）と検量線とからグルコース濃度を求めた。その結果を表2に示す。なお、このバイオセンサ1Aにあっても、電極間に印加する測定用微弱電圧は、0.6 Vであり、センサ出力は10<sup>-9</sup> Aのオーダーの電流値として観測された。また、自己温度制御ヒータ10については、バイオセンサ1と同様、常時0.1 Aの電流を通電しておき、37℃で自己温度制御させた。

【表2】

形も可能である。例えば、グルコースオキシダーゼに替えて、ピラノースオキシダーゼやムクロターゼ等の酵素、或いは、*Pseudomonas fluorescens* といった微生物を用いたグルコース測定用のセンサであってもよい。また、これらグルコース測定用の生体物質に限らず種々の酸化還元酵素や加水分解酵素等を生体物質を用いたセンサとすることもできるは勿論である。例えば、次のような生体物質と測定対象との組み合わせを例示することができる。グルクロン酸オキシダーゼを用いたグルクロン酸測定用のセンサ。ペキシキナーゼを用いたグルコース測定用のセンサ。ビリルビンオキシダーゼを用いたビリルビン測定用のセンサ。ウリアーゼを用いた尿素測定用のセンサ。ウリカーゼを用いた尿酸測定用のセンサ。コレステロールオキシダーゼを用いたコレステロール測定用のセンサ。アスコルビン酸オキシダーゼを用いたアスコルビン酸測定用のセンサ。ヒラジ、酸オキシダーゼを用いたヒラジ、酸測定用のセンサ。乳酸オキシダーゼを用いた乳酸測定用のセンサ。乳酸脱ヒドロゲナーゼを用いた乳酸測定用のセンサ。グルタミ、酸デヒドロゲナーゼを用いたグルタミ、酸測定用のセンサ。

【0032】また、上記した各実施例においては、識別層にフェロセン誘導体やニヒキソールの電子移動体、或いは妨害物質除去作用をなす過ヨウ素酸ソーダ（妨害物質除去剤）を担持した場合について説明したが、これら電子移動体や妨害物質除去剤を担持しない識別層を備えたバイオセンサであっても良い。或いは、妨害物質除去剤を生体物質とともに担持しただけの識別層を備えたバイオセンサであっても良い。更に、電子移動体、或いは妨

30

10

50

害物質除去剤として、次のようなものを用いることもできる。

#### 電子移動体

フェロセン、ピロール、ユビキノンとその誘導体など

#### 妨害物質除去剤

過塩素酸ソーダ ( $\text{NaClO}_4$ )、過臭素酸ソーダ ( $\text{NaBrO}_3$ )、過ヨウ素酸カリウム ( $\text{KIO}_4$ )、過塩素酸カリウム ( $\text{KClO}_4$ )、過臭素酸カリウム ( $\text{KBrO}_3$ ) など

【0033】上記実施例では、作用極5と参照極6及び対極7の三つの電極を一組の電極として備えるバイオセンサについて説明したが、参照極を省略して作用極5と対極7の二極の電極を一組の電極として備えるバイオセンサであってもよい。

【0034】加えて、自己温度制御ヒータ10の自己制御温度を37℃に設定した場合について説明したが、この温度に限るわけではなく、測定時における被測定溶液の温度等に応じて適宜設定すれば良い。この場合には、自己温度制御ヒータ10形成用のPt-Pd合金におけるPtとPdとの混合割合（重量比）を変更すれば良

【0035】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明のバイオセ

ンサによれば、表面に識別層が形成された作用極近傍を所定温度に維持することにより、被測定溶液の温度の相違に基づく測定対象物質濃度の測定精度の低下を、温度補正等といった特別な処理を行なうことなく簡単に回避できる。しかも、作用極近傍を所定温度に維持するに当たって、自己温度制御ヒータを用いることにより、フィードバック制御等を行なうことなく作用極近傍温度を所定温度に維持できる。また、維持する温度を測定時における被測定溶液温度にすることで、作用極近傍温度と被測定溶液温度との差を小さくして、より一層の精度向上を図ることができる。

【0036】

【図面の簡単な説明】

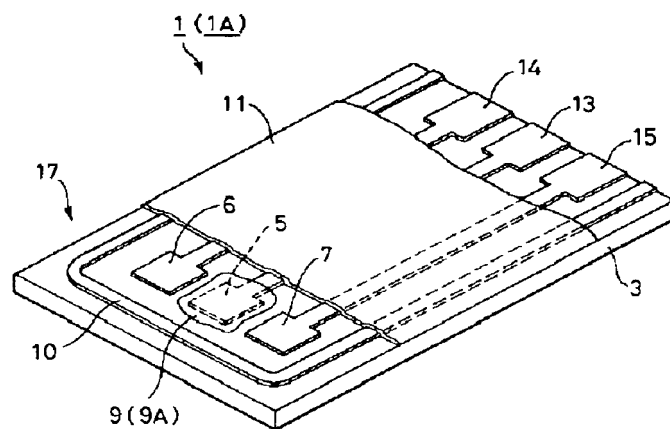
【図1】実施例のバイオセンサ1の概略斜視図。

【図2】実施例のバイオセンサ1のセンサ出力からグルコース濃度を算出するための検量線のグラフ。

【符号の説明】

- 1、1A バイオセンサ
- 3 絶縁基板
- 5 作用極
- 6 参照極
- 7 対極
- 9、9A 識別層
- 10 自己温度制御ヒータ
- 17 感応部

【図1】



【図2】

